

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

10.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月12日

REC'D 30 OCT 2003

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-267184

WIPO PCT

[ST. 10/C]: [JP2002-267184]

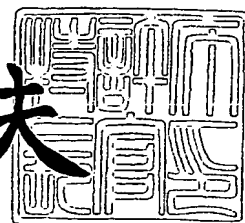
出 願 人
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【氏名】
【整理番号】
【あて先】
【国際特許分類】
特許願
JP421
特許庁長官殿
C12N 15/09
A61K 39/395
C12P 21/08

【発明者】
【住所又は居所】
【氏名】
【発明者】
鹿児島県鹿児島市皇徳寺台5-20-5
杉村 和久

【住所又は居所】
【氏名】
【発明者】
熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 財団法
人 化学及血清療法研究所 菊池研究所内
中島 敏博

【住所又は居所】
【氏名】
【発明者】
熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 財団法
人 化学及血清療法研究所 菊池研究所内
西原 司

【明細書】
【図面】
【要約書】
【発明の概要】
【発明の利便性】
【発明の産業上の利用可能性】
【発明の産業上の利用可能性】
000173555
熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
財団法人 化学及血清療法研究所
内野 矜自

【発明の概要】
【発明の利便性】
【発明の産業上の利用可能性】
056568
21,000円

明細書 1
図面 1
要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト抗ヒトMCP-1抗体及び該抗体フラグメント

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトMonocyte chemoattractant protein-1（以下、ヒトMCP-1とする）に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトMCP-1抗体のVH鎖またはその一部をコードする遺伝子断片。

【請求項2】 当該VH鎖の相補性決定領域（CDR1～3）が下記のアミノ酸配列を有する請求項1に記載の遺伝子断片。

CDR1: Ser Tyr Ala Ile Ser <配列番号3>

CDR2: Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly <配列番号4>

CDR3: Asp Leu Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val <配列番号5>

【請求項3】 当該抗体VH鎖が、配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる請求項1または2に記載の遺伝子断片。

【請求項4】 当該抗体VH鎖が配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる請求項1から3のいずれかに記載の遺伝子断片。

【請求項5】 ヒトMCP-1に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトMCP-1抗体のVL鎖またはその一部をコードする遺伝子断片。

【請求項6】 当該VL鎖の相補性決定領域（CDR1～3）が下記のアミノ酸配列を有する請求項5に記載の遺伝子断片。

CDR1: Arg Ser Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu His <配列番号8>

CDR2: Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser <配列番号9>

CDR3: Gln Gln Ser Phe Thr Thr Pro Leu Thr <配列番号10>

【請求項7】 当該抗体VL鎖が、配列表配列番号6に記載のアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる請求項5または6に

記載の遺伝子断片。

【請求項 8】 当該抗体 V L 鎖が配列表配列番号 6 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる請求項 5 から 7 のいずれかに記載の遺伝子断片。

【請求項 9】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の V H 鎖をコードする遺伝子及び請求項 5 から 8 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子を結合してなる一本鎖 F v (以下、s c F v と省略する) 遺伝子断片。

【請求項 10】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の V H 鎖をコードする遺伝子及び請求項 5 から 8 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子を、それぞれヒト抗体 C H 鎖遺伝子及びヒト抗体 C L 鎖遺伝子と結合してなるヒト抗ヒト M C P - 1 抗体をコードする遺伝子断片。

【請求項 11】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の V H 鎖をコードする遺伝子及び請求項 5 から 8 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子を、それぞれヒト抗体 C H 鎖遺伝子の一部及びヒト抗体 C L 鎖遺伝子の一部と結合してなるヒト抗ヒト M C P - 1 抗体フラグメントをコードする遺伝子断片。

【請求項 12】 当該抗体フラグメントが、F a b、F a b'、または F (a b')₂ から選ばれる請求項 11 に記載の遺伝子断片。

【請求項 13】 請求項 9 に記載の s c F v 遺伝子を、ヒト抗体 C H 鎖遺伝子の一部、またはヒト抗体 C L 鎖遺伝子の一部と結合してなるヒト抗ヒト M C P - 1 抗体フラグメントをコードする遺伝子断片。

【請求項 14】 請求項 1 から 13 のいずれかに記載の遺伝子断片を発現ベクターに組み込み、遺伝子組換え法により発現されるヒト抗ヒト M C P - 1 抗体またはヒト抗ヒト M C P - 1 抗体フラグメント。

【請求項 15】 請求項 14 に記載のヒト抗ヒト M C P - 1 抗体またはヒト抗ヒト M C P - 1 抗体フラグメントに高分子修飾剤を結合させた修飾蛋白分子。

【請求項 16】 請求項 14 に記載のヒト抗ヒト M C P - 1 抗体またはヒト抗ヒト M C P - 1 抗体フラグメント、または請求項 15 に記載の修飾蛋白分子を有効成分として含有するヒト M C P - 1 活性阻害剤。

【請求項 17】 請求項 16 に記載のヒト M C P - 1 活性阻害剤を用いるヒト M C P - 1 により惹起される炎症及び免疫異常性疾患の予防または治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト Monocyte chemoattractant protein-1 (以下、ヒト MCP-1 とする) に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒト MCP-1 抗体または該抗体フラグメントに関する。当該抗体及び抗体フラグメントは、MCP-1 が原因となって惹起される炎症、免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

ケモカインは 8～10 kDa のペプチドタンパク質で、白血球の遊走や活性化において重要な役割を担っている。ケモカインは N 末端の 4 つのシステイン (C) のうち最初の 2 つのシステインの並び方により、C ケモカイン、CC ケモカイン、CXC ケモカイン、CX₃C ケモカインの 4 つのサブグループに分けられる。MCP-1 は CC ケモカインサブファミリーに属するケモカインで、1989 年にヒトのグリオーマ細胞株および単球性白血病細胞株からクローニングされた、76 アミノ酸残基からなる単球走化性因子である (例えば、非特許文献 1 参照)。MCP-1 は単球、血管内皮細胞、繊維芽細胞などから産生され、単球、T 細胞および好塩基球に作用し、それらの遊走活性、活性酸素・リソソーム酵素の産生放出、サイトカイン産生誘導、好塩基球の脱顆粒、接着分子の発現誘導ヒスタミン・ロイコトリエンの産生放出などを促進する多機能な分子である。

【0003】

慢性炎症を中心に疾患モデル動物を用いた解析が進められ、いくつかの炎症性疾患において MCP-1 の関与が示されている (例えば、非特許文献 2 参照)。更に、これらの疾患モデル動物の MCP-1 の活性を阻害すると、症状が抑制されることが報告されている。例えば、ラットのコラーゲン誘導性関節炎 (以下、CIA と省略することがある) やアジュバント関節炎モデルで、抗 MCP-1 抗体を投与すると関節炎症状が軽減され、関節炎の予防効果や治療効果があることが報告されている (例えば、非特許文献 3 及び非特許文献 4 参照)。また、関節炎を自然発症し生涯持続する MRL-lpr マウスでは、MCP-1 を投与すると関節

炎が増悪するが、MCP-1 のアンタゴニストを投与すると関節炎が抑制されることが報告されている（例えば、非特許文献 5 参照）。

【0004】

また更に、MCP-1 やそのレセプターである CCR2 の遺伝子欠損マウスを用いた解析が進められ、いくつかの炎症性疾患において、病態形成に関わるマクロファージ浸潤に MCP-1 / CCR2 が必須であることが示されている。例えば、自己免疫疾患マウスの MCP-1 を欠損させるとマクロファージや T 細胞の遊走が抑制され、腎・肺・皮膚などの各臓器が保護される事により生存率が改善されることや、CCR2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスでは実験的に腹腔に誘発した炎症に対して、マクロファージの浸潤が抑制されることが報告されている（例えば、非特許文献 6 参照）。また、動脈硬化モデルマウスの MCP-1、あるいは CCR2 を欠損させると動脈壁のマクロファージ遊走・硬化巣形成を抑制するという報告がある（例えば、非特許文献 7 及び非特許文献 8 参照）。

【0005】

ヒトの疾患との関連においては、変形性関節炎と比較して慢性関節リウマチ（以下、RA と省略することもある）患者では滑膜液中の MCP-1 の濃度が高く、炎症性細胞浸潤ならびに炎症の誘発・増強に中心的な役割を果たしていることが示唆されている（例えば、非特許文献 9 及び非特許文献 10 参照）。また、疫学的な調査から、心筋梗塞や動脈硬化症の発症に MCP-1 が関与し、MCP-1 の細胞遊走活性がリスクファクターとなることが明らかにされていることから、MCP-1 抗体を用いて細胞遊走活性を抑えることができれば、心筋梗塞や動脈硬化の予防及び治療に寄与する事が期待される。

【0006】

以上のように MCP-1 は慢性の炎症性疾患や動脈硬化症において、炎症性細胞の浸潤や炎症の誘発に関わっていることが明らかとなってきた。よって、MCP-1 の生物活性を中和する特異的なモノクローナル抗体を開発すれば、マクロファージ浸潤の主要な因子である疾患において有効な治療手段になることが期待される。これまでに、MCP-1 に結合するマウスやラット由来のモノクローナル抗体はいくつか取得されており、実際に抗 MCP-1 モノクローナル抗体による

ラット馬杉型腎炎におけるマクロファージの浸潤抑制、ラット肺高血圧モデルにおけるマクロファージの浸潤抑制・右心室圧上昇抑制・肺細動脈内膜肥厚の抑制等が報告されている（例えば、非特許文献11及び12参照）。

【0007】

しかしながら、それらは主に異種動物由来のモノクローナル抗体であり、ヒトに対して投与した場合は異物として認識・排除されるため、薬剤として利用することは困難である。とりわけRAのような慢性の自己免疫性疾患の治療では、長期間の継続投与が行われるので、投与抗体に対する抗体の出現が問題となる。この問題点を解決する方策として、ヒト由来の抗ヒトMCP-1モノクローナル抗体の取得法がある（例えば、特許文献1参照）。すなわち、抗ヒトMCP-1抗体を産生するヒトリンパ球をエプスタイン・バー・ウイルス（以下、EBVと省略することがある）で形質転換し、得られた形質転換細胞とヒトミエローマ細胞とを細胞融合したハイブリドーマから得られる抗体である。しかしながらここで得られた抗体はIgM抗体であるので、IgG抗体と比較して高い親和性は得にくく、また取り扱いも不便である。またEBV形質転換細胞では抗体産生量が少なく、実用的に応用する上でも問題が多い。更に、特許文献1に記載のヒトMCP-1に対するIgM抗体は、ヒトMCP-1との結合性は明記されているが、中和活性は明らかにされていない。

【0008】

上記の方法以外にヒトMCP-1に対するマウスモノクローナル抗体を、遺伝子工学的手法を用いてヒト型化することも可能である。しかしながら、ヒト型化抗体でも、慢性疾患患者に対する繰り返し投与や長期投与した際に、抗ヒトMCP-1抗体の活性を阻害するような抗体（阻止抗体）が作り出される可能性も否定できなかった。

【0009】

【特許文献1】

特開平9-67399号公報

【非特許文献1】

Yoshimura, T. ら、“FEBS Letter”、1989年、第244巻、p

. 487-493

【非特許文献2】

Schrier, DJ. ら、"Journal of Leukocyte Biology"、1998年、第63巻、p. 359-363

【非特許文献3】

Youssef, S. ら、"Journal of Clinical Investigation"、2000年、第106巻、p. 361-371

【非特許文献4】

Ogata, H. ら、"Journal of Pathology"、1997年、第182巻、p. 106-114

【非特許文献5】

Gong, JH. ら、"Journal of Experimental Medicine"、1997年、第186巻、p. 131-137

【非特許文献6】

Kurihara, T. ら、"Journal of Experimental Medicine"、1997年、第186巻、p. 1757-1762

【非特許文献7】

Gosling, J. ら、"Journal of Clinical Investigation"、1999年、第103巻、p. 773-778

【非特許文献8】

Boring L., ら、"Nature"、1998年、第394巻、p. 894-897

【非特許文献9】

Akahoshi, T. ら、"Arthritis and Rheumatism"、1993年、第36巻、p. 762-771

【非特許文献10】

Koch, AE. ら、"Journal of Clinical Investigation"、, 1992年、第90巻、p. 772-779

【非特許文献11】

Wada, T. ら、"FASEB Journal"、1996年、第10巻、p. 1418-1425

【非特許文献12】

Kimura, H. ら、"Lab. Invest."、1998年、第78巻、p. 571-581

【0010】

【課題を解決するための手段】

このような状況を鑑み、本発明者らが鋭意研究を重ねた結果、健常人の末梢血Bリンパ球より調製した免疫グロブリン遺伝子のVH、VLを材料として構築したファージディスプレイライブラリーから取得した、完全ヒト抗ヒトMCP-1一本鎖Fv (scFv) 分子を取得し、そのVH鎖及びVL鎖を明らかにした。当該ヒト抗体の配列情報を用いて作製される完全ヒト抗ヒトMCP-1抗体及び該抗体フラグメントは、ヒトMCP-1の活性を阻害し、炎症性疾患の予防・治療用として提供されるものである。

【0011】

【発明の実施の形態】

本願発明のヒトMCP-1と結合するヒト抗体及び該抗体フラグメントは、例えば以下のようにして作製することができる。

【0012】

健常人の末梢血Bリンパ球よりmRNAを抽出し、免疫グロブリン遺伝子のVH鎖、VL鎖を、その両端を規定するプライマー対を用いてRT-PCR法により増幅し、多様な配列を有するH鎖、L鎖のV領域集団を得る。次に更にペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅して、H鎖、L鎖のV領域のランダムな組み合わせによる多様なscFv DNA集団を調製する。得られたscFv DNAをファージミドベクターpCANTAB5Eに組み込み、scFvディスプレイファージライブラリーを作製する。このライブラリーをプラスチックチューブに固相化したヒトMCP-1と反応させ、洗浄により未反応のscFvディスプレイファージを除去した後に、ヒトMCP-1と結合しているscFvファージ

クローンを酸で溶出する。分離したファージクローンから s c F v DNA を調製し、これを発現ベクターに組み込み、該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って培養して目的の s c F v 蛋白のみを得ることが出来る。

【0013】

s c F v DNA の発現方法としては、例えば、大腸菌で発現させることができる。大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列等、発現させる s c F v を機能的に結合させて発現させることが出来る。例えばプロモーターとしては、lacZ プロモーター、araB プロモーター等を挙げることができる。s c F v の分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに発現させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, SP., et al, J. Bacteriol., 1987, 169 : 4379-4383) を用いるとよい。培養上清中に分泌させるには M13 ファージの g 3 蛋白のシグナル配列を用いることもできる。

【0014】

前記のように発現された s c F v は細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本願発明で発現される s c F v は、その C 末端に E tag 配列が付加されているので、抗 E tag 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、容易に短時間で精製することができる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を組み合わせて精製することも可能である。例えば、限外濾過、塩析、ゲル濾過／イオン交換／疎水クロマト等のカラムクロマトグラフィーを組み合わせれば抗体を分離・精製することができる。

【0015】

本願発明により得られた s c F v 蛋白は、ヒト MCP-1 に対する結合活性を有することが明らかになった。本願発明で使用される抗ヒト MCP-1 抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、BIAcore 等の方法がある。例えば ELISA を用いる場合、ヒト MCP-1 を固相化した 96 穴プレートに目的の抗ヒト MCP-1 抗体や抗体フラグメントを含む試料、例えば大腸菌の培養上清や精製抗体を加える。次にパーオキシダーゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、発色基質 TMBZ を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することが出来る。

【0016】

さらにまた、本願発明により得られた s c F v 蛋白は、ヒト MCP-1 の有する細胞遊走活性を阻害することが明らかとなった。ヒト MCP-1 による感受性細胞の遊走（ケモタキシス）は、通常用いられるケモタキシスアッセイ、例えば Grobらの方法（Grob. PM., et al, J. Biol., Chem., 1990, 265 : 8311-8316）を用いて調べることが出来る。具体的には市販されているケモタキシスチャンバーを用い、抗ヒト MCP-1 抗体とヒト MCP-1 を培養液、例えば、RPMI 1640 で各々希釈して混合し、室温で一定時間インキュベーションを行い、この混合液をフィルターで仕切られたチャンバーの下層に添加する。次いでヒト MCP-1 感受性細胞懸濁液、例えば、単球系の細胞株 THP-1、あるいはヒト末梢血単核球（以下、PBMC と省略することがある）をチャンバーの上層に添加して 37℃ で一定時間放置する。遊走する細胞はチャンバーに装着されたフィルターを通過して下層に移動するので、フィルターに付着した細胞をギムザ染色液等で染色して細胞数をカウントすればよい。あるいは下層に移動した細胞数をコーンターカウンター等でカウントしても良い。また、チャンバーに代わり、ディスポーザブルのケモタキシスアッセイ用のセルが市販されているので、それを使用しても良い。このケモタキシスアッセイ系で、本願発明の s c F v 蛋白はヒト MCP-1 の細胞遊走活性を阻害することが明らかとなった。

【0017】

このように、本願発明により得られる s c F v 蛋白は、ヒト MCP-1 の細胞遊走活性を濃度依存的に阻害することから、当該細胞遊走により惹起される疾患の予防または治療に有効であると期待される。

【0018】

上記阻害活性を有する s c F v クローンの V H 鎖及び V L 鎖のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列は、下記の通りである。

[V H 鎖]（配列番号 1）

cag gta cag ctg cag cag tca ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1

5

10

15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg	144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
gga ggt ttt gat cct gaa gat ggt gaa aca atc tac gca cag aag ttc	192
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac aca gcc tac	240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aca gat ctt ggc gga ggt gac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg	336
Ala Thr Asp Leu Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp	
100 105 110	
ggc cca ggg acc acg gtc acc gta tcc tca	366
Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

【 0 0 1 9 】

[V L 鎖] (配列番号 6)

gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gct tct gtc ggg	48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac aga gcc acc atc tct tgc cgg tct agt cag agc att aac acc tat	96
Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr	
20 25 30	

tta cat tgg tat cag cag aaa cca ggg gaa gcc cct aaa ctc ctg atc	144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
tat gct gct tcc acc ttg caa agt ggg gtc cca tca aga ttc agt ggc	192
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc acc act ctc caa cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Thr Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag agt ttc act acc cca ctc	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Thr Thr Pro Leu	
85 90 95	
act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt	324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	
100 105	

【 0 0 2 0 】

さらに、上記配列中、VH鎖及びL鎖のCDR 1～3のアミノ酸配列を下記に示す。

[VH鎖]

CDR 1 : Ser Tyr Ala Ile Ser <配列番号 3>

CDR 2 : Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly <配列番号 4>

CDR 3 : Asp Leu Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val <配列番号 5>

[VL鎖]

CDR 1 : Arg Ser Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu His <配列番号 8>

CDR 2 : Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser <配列番号 9>

CDR 3 : Gln Gln Ser Phe Thr Thr Pro Leu Thr <配列番号 10>

【 0 0 2 1 】

また、当該抗体VH鎖またはVL鎖が、上記のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列でもよい。

【0022】

本発明で開示されるVH鎖及び／またはVL鎖は、ファージ抗体法を用いてscFvの形で得られたものであるが、原則としてその適用はscFvに限定されることはなく、開示したVH鎖及び／またはVL鎖をヒト免疫グロブリンの定常部と連結した完全分子型、またヒト免疫グロブリンの定常部の一部と組み合わせたFab、Fab'またはF(ab')₂、さらにscFvをヒト免疫グロブリンの定常部と結合させた一本鎖抗体(scAb)などの他の抗体フラグメントもその適用範囲に含まれる。また、これらの抗体及び抗体フラグメント蛋白分子に、ポリエチレングリコールなどの高分子修飾剤を結合させた修飾蛋白分子も同様である。H鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたscFvを調製する場合、ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸10～25残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0023】

以上より、本発明のヒトモノクローナル抗体及び該抗体フラグメント分子は、ヒト由来抗ヒトMCP-1抗体の可変領域を有し、ヒトMCP-1と強く反応して、ヒトMCP-1とヒトMCP-1受容体間の結合に阻害作用を示す。さらに、本発明のヒトモノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子は、ヒトMCP-1によって惹起される種々の免疫応答を阻害することができ、当該免疫応答により惹起される炎症及び免疫異常性疾患の予防または治療薬、例えば抗炎症剤あるいは自己免疫疾患の治療及び予防のための薬剤として使用することができる。さらに、本発明の抗体及び抗体フラグメントは心筋梗塞や動脈硬化の予防及び治療に寄与する事が期待される。

【0024】

以下、本願発明を実施例に基づき詳細に説明するが、本願発明は何らこれらに限定されるものではない。

【0025】

【実施例】**《実施例 1：健常者からのファージライブラリーの構築》**

ファージライブラリーの構築は、J. D. Marks ら (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991) により報告されている方法を参考に、健常者 20 名由来末梢血由来リンパ球を出発材料に、構築した。構築した $VH(\gamma)-V\kappa$ 、 $VH(\gamma)-V\lambda$ 、 $VH(\mu)-V\kappa$ 、 $VH(\mu)-V\lambda$ の各サブライブラリーはそれぞれ 1.1×10^8 、 2.1×10^8 、 8.4×10^7 、 5.3×10^7 クローンの多様性を有すると評価された。

《実施例 2：パンニング》

ヒト MCP-1 は 0.1M $NaHCO_3$ 1mL に溶解し、35mm のディッシュ (岩城) に 4℃ で一晩反応させて固定化した。0.5%ゼラチン/PBS を用いて 20℃ で 2 時間ブロッキングした後、0.1%Tween20-PBS で 6 回洗浄した。これに健常人由来の抗体ファージライブラリー (一本鎖抗体提示ファージ液) を 0.9mL (1×10^{12} tu/mL) 加え、反応させた。

【0026】

0.1%Tween20-PBS で 10 回洗浄した後、1.0mL のグリシン緩衝液 (pH2.2) を加え、ヒト MCP-1 と結合する一本鎖抗体提示ファージを溶出させた。溶出したファージは 1M Tris (hydroxymethyl)aminomethane-HCl, pH9.1 を加えて pH を調製した後、対数増殖期の大腸菌 TG1 に感染させた。感染後の TG1 は $3000 \times g$, 10 分で遠心分離して、上清を除き、200 μ L の 2 \times YT 培地で懸濁し、SOBAG プレート (2%グルコース、100 μ g/ml のアンピシリン含有 SOB プレート) に播き、30℃ のふ卵器中で一晩培養した。生じたコロニーは適量の 2 \times YT 培地を加えスクレイパー (Costar) を使って懸濁、回収した。

【0027】

この TG1 液 50 μ L を、30mL の 2 \times YT AG 培地に植え、ヘルパーファージを用いてレスキューし、スクリーニング後のファージライブラリーを調製した。健常人由来ファージライブラリー $VH(\gamma)-V\kappa$ 、 $VH(\gamma)-V\lambda$ 、 $VH(\mu)-V\kappa$ 、 $VH(\mu)-V\lambda$ 、それぞれについて前述のヒト MCP-1 固定化プレートを用いてパンニングを計 4 回行った。4 回目のパンニング後に、SOBAG プレートから任意にクローンを抽出し、scFv の発現の確認及びヒト MCP-1

ELISAによる特異性の確認と塩基配列の解析を行った。

【0028】

《実施例3：スクリーニング ヒトMCP-1 ELISA》

分離したクローンのスクリーニングのためのELISAは以下のように行った。ヒトMCP-1及びヒトMIP-1 α をELISAプレートに固定化してスクリーニングに用いた。2 μ g/mLのヒトMCP-1或いはヒトMIP-1 α 、2.5 μ g/mLのヒト血清アルブミン(HSA)を40 μ L/well ELISAプレート(Nunc)に入れ、4℃で16時間静置し、固定化した。固定化プレートは、0.5%BSA、0.5%ゼラチン及び5%スキムミルクを含むPBS溶液400 μ L/wellをELISAプレートに入れ、4℃で2時間静置し、ブロッキングを行った。

【0029】

s c F v提示ファージを含む試料液を40 μ L/wellを入れて反応させた後、試料液を捨て洗浄液で5回洗った。ビオチン標識した抗M13モノクローナル抗体(Pharmacia biotech)と反応させ、アルカリフォスファターゼ(AP)標識した抗マウスIgG抗体と反応させた。洗浄液で5回洗った後、発色基質液(1g/mL p-nitrophenyl phosphate(Wako)、10%ジエタノールアミン(Wako)を含むPBS溶液)を50 μ L/well入れ、遮光し、室温～37℃で、5～10分発色させた。マルチプレートオートリーダーNJ-2001(Inter Med)で405nmの吸光度を測定した結果、評価したクローン全てが、ヒトMCP-1に特異的であることが確認できた(図1)。

【0030】

《実施例4：クローンの配列分析》

単離したクローンのs c F v遺伝子のVH及びVLのDNA塩基配列をDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit(Applied Biosystems)を用いて決定した。ELISA及び配列分析の結果、単離したクローンは4種に分類された。

【0031】

《実施例5：ヒト由来抗ヒトMCP-1 s c F vの発現と精製》

前記実施例2、3で単離したヒトMCP-1に反応する4種のs c F vクロー

ン、MC 8、MC 15、MC 32、MC 59からプラスミドDNAを回収して、常法に従って大腸菌HB1251を形質転換した。2%グルコースを含む2×YT培地でこれら的大腸菌を一夜前培養後、グルコースフリーの2×YT培地に一部移植し、終濃度1mM IPTGを加えて更に一夜培養してs c F vの発現誘導を行った。培養終了後菌体を遠心回収し、1mM EDTAを含むPBSに懸濁して氷中に30分菌体を放置した。次いで8,900×gで30分間遠心し、上清を回収して0.45μmフィルター濾過後、ペリプラズム画分からのs c F vの精製出発材料とした。

【0032】

このようにして調製した精製の出発材料を、抗E tag抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで常法に従って精製した。PBSで透析後、エンドトキシン除去カラムDetoxi-gel (PIERCE社)で添付のプロトコルに従いエンドトキシンを除去した。分子量カット10,000のCentricon (Amicon社)で濃縮後、0.45μmフィルター濾過して精製標品とした。

【0033】

《実施例6：精製s c F vのヒトMCP-1との結合性》

次に精製s c F vのヒトMCP-1との結合性をELISA法で測定した。PBSで0.5μg/mLに調製したヒトMCP-1を固相化した96穴プレート (NUNC. MAXISORP) に、精製抗体を100μL加えて37℃で1時間反応させた。0.05%Tween-PBS (以下PBSTと省略することもある) で5回洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗E tag抗体と更に37℃1時間反応させた。PBSTで5回洗浄後、発色基質液を加えて呈色させ、450nmの吸光度を測定して結合性を評価した。結果を図2に示す。4種の抗体は全て濃度依存的にヒトMCP-1と結合した。

【0034】

《実施例7. ヒトMCP-1の細胞遊走活性に対する作用》

ヒトMCP-1の単球に対する遊走活性の阻害効果をケモタキシスアッセイ法にて調べた。24穴プレートの各穴にポアサイズ8μmのTranswell (Costar社) をセットする。この24穴プレートに1%FCSを含むRPMI 1640 (以下1%FCS-RPMIと省略することもある) 培地を540μL加えた。次に、濃度調製したs c F vと 2×10^{-8} MのヒトMCP-1 (CHEMICON社) を当量混合して室温で30分イ

ンキュベーションを行い、この反応液を540 μ Lの培地を入れた24穴プレートに60 μ L加えた。Transwellの方に1%FCS-RPMI 100 μ Lとヒト単球系の細胞株THP-1の 1×10^6 cells/mL 200 μ Lを添加して、37 $^{\circ}$ Cで4時間放置した。8 μ mのフィルターで仕切られた上方のTranswellに細胞が、下方の24穴プレートに抗体の混合液が設置されることになる。フィルターを通過して24穴に遊走してくる細胞をコールターカウンター（コールター社）で計測した。アッセイ結果を図3に示す。4種の抗体の中でMC15およびMC32にはヒトMCP-1の細胞遊走活性を阻害する効果が認められた。

【0035】

【発明の効果】

このように、本願発明のヒトMCP-1に対するヒト由来scFvは、ヒトMCP-1と特異的に結合し、ヒトMCP-1の細胞遊走活性を阻害するものであることが示された。従って、当該scFv及びscFvのVH鎖及びVL鎖をヒト定常領域またはその一部と結合させたヒト抗ヒトMCP-1抗体またはその抗体フラグメントは、ヒトMCP-1の関与する疾患、例えば慢性炎症性疾患や動脈硬化症等の治療への適用が期待される。また、ヒトMCP-1とは結合するが抑制作用を示さなかった抗体を含めてこれらの抗体で、ヒトMCP-1の血中濃度を測定し、病態の症状の変動をモニターすることもできる。

【 0 0 3 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

<120> Human antibody against human MCP-1 and the antibody fragment

<130> JP421

<160> 10

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

cag gta cag ctg cag cag tca ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1

5

10

15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

gga ggt ttt gat cct gaa gat ggt gaa aca atc tac gca cag aag ttc 192

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac aca gcc tac 240

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65

70

75

80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

gca aca gat ctt ggc gga ggt gac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg 336

Ala Thr Asp Leu Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100

105

110

ggc cca ggg acc acg gtc acc gta tcc tca 366

Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Thr Asp Leu Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100

105

110

Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> CDR1 of SEQUENCE No.1

<400> 3

Ser Tyr Ala Ile Ser

35

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> CDR2 of SEQUENCE No.1

<400> 4

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

50

55

60

65

Gly

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> CDR3 of SEQUENCE No.1

<400> 5

Asp Leu Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

100

105

110

<210> 6

<211> 324

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gct tct gtc ggg 48

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

gac aga gcc acc atc tct tgc cgg tct agt cag agc att aac acc tat 96

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr

20

25

30

tta cat tgg tat cag cag aaa cca ggg gaa gcc cct aaa ctc ctg atc 144

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

tat gct gct tcc acc ttg caa agt ggg gtc cca tca aga ttc agt ggc 192

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc acc act ctc caa cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Thr Leu Gln Pro

65

70

75

80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag agt ttc act acc cca ctc 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Thr Thr Pro Leu

85

90

95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt 324

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Thr Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Thr Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> CDR1 of SEQUENCE No.6

<400> 8

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu His
25 30

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> CDR2 of SEQUENCE No.6

<400> 9

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

50

55

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> CDR3 of SEQUENCE No.6

<400> 10

Gln Gln Ser Phe Thr Thr Pro Leu Thr

90

95

【図面の簡単な説明】

【図1】 分離クローンのs c F vのヒトMCP-1への特異性を評価したELISAの結果を示す図。

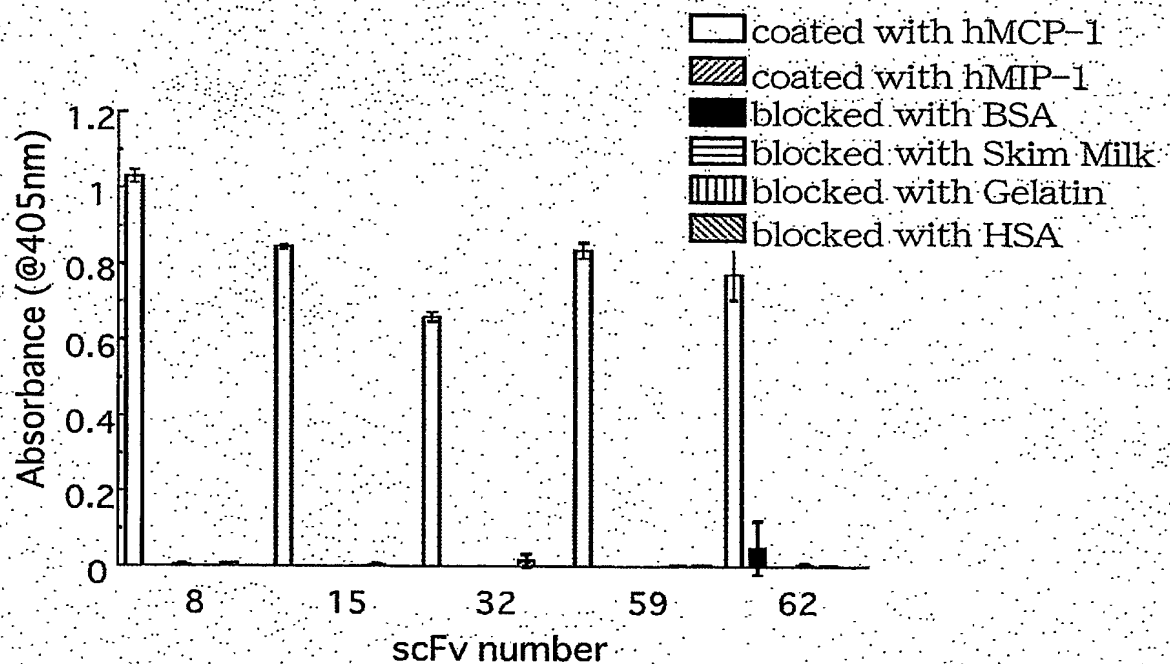
【図2】 精製したヒト由来s c F vのヒトMCP-1との結合性をELISAで測定した図。

【図3】 ヒトMCP-1によるヒト単球系細胞株THP-1の細胞遊走をs c F vが阻害することを示す図。

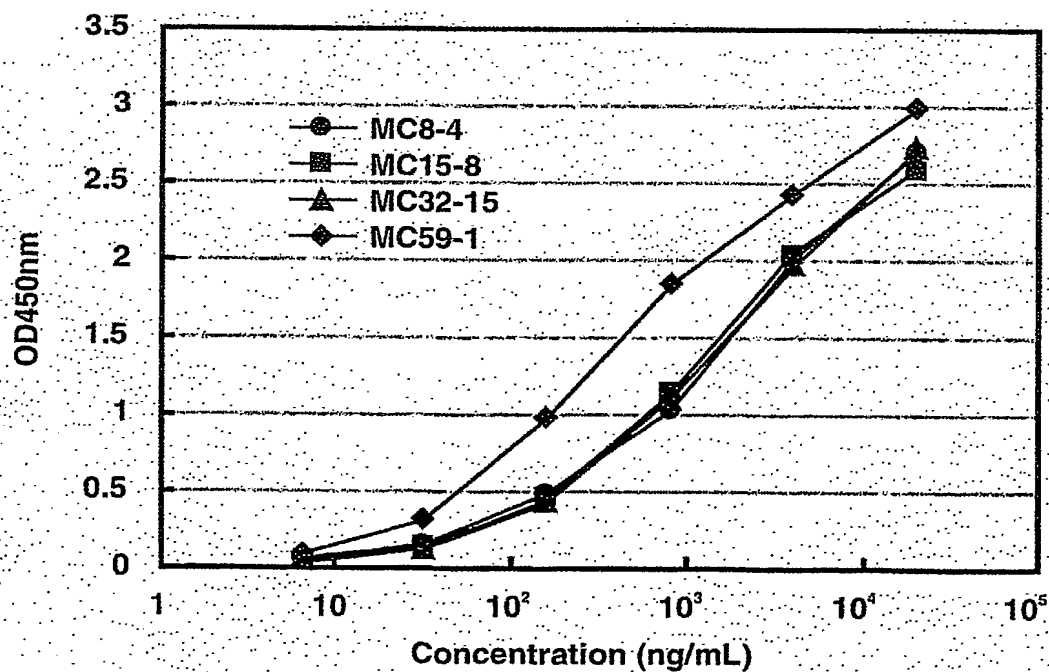
【書類名】

図面

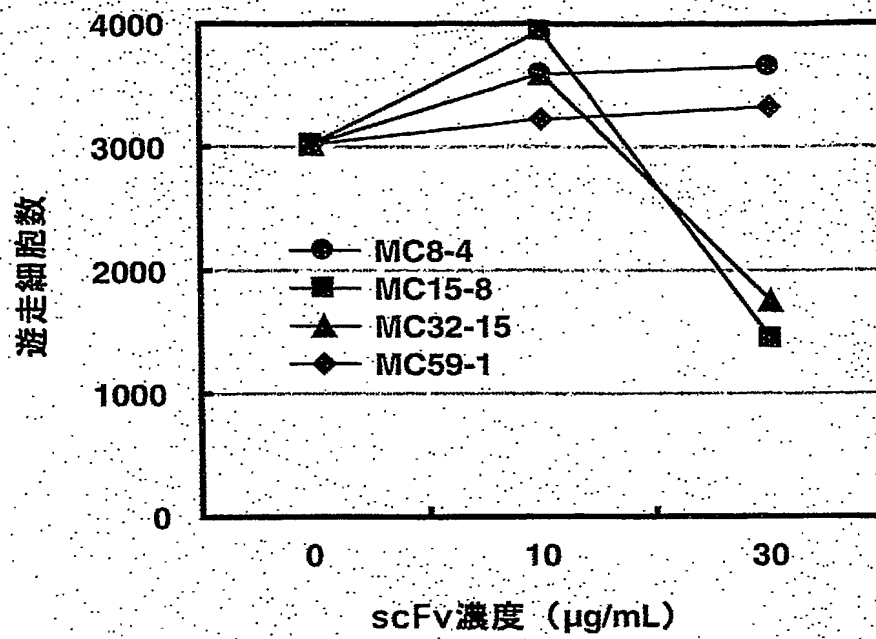
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 MCP-1 が関与する免疫異常性疾患の治療に有効な物質の提供。

【解決手段】 ファージ抗体法を用いて、ヒト MCP-1 に対して高い親和性を有する scFv を得た。当該 scFv より得られる VH 鎖及び VL 鎖情報を基に、ヒト抗ヒト MCP-1 抗体及びヒト抗ヒト MCP-1 抗体フラグメントが得られる。当該抗体及び抗体フラグメントは、MCP-1 が原因となって惹起される炎症、免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-267184
受付番号	50201370020
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 9月13日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 9月12日

次頁無

特願 2002-267184

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所